

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

19/37,DE/32 (Item 32 from file: 351)

009606013 WPI Acc No: 93-299561/38

XRAM Acc No: C93-133234

New complex antibody for anticancer drug - comprises anti-human C-  
erbB@-2 antibody that recognises surface antigen of target cell, and  
anti-human lymphocyte antibody which binds to effector cell

Index Terms: NEW COMPLEX ANTIBODY ANTICANCER DRUG COMPRISE ANTI HUMAN  
ANTIBODY RECOGNISE SURFACE ANTIGEN TARGET CELL ANTI HUMAN LYMPHOCYTE  
ANTIBODY BIND EFFECTOR CELL

Patent Assignee: (SAKA ) OTSUKA PHARM CO LTD

Number of Patents: 001

Number of Countries: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Week	Applic No	Date	LA	Pages	IPC
JP 5213775	A	930824	9338	JP 9219968	920205		12	@A61K-039/395 @ (B)

Priority Data (CC No Date): JP 9219968 (920205)

Abstract (Basic): JP 05213775 A

A new complex antibody (a) an anti-human c-erbB@-2 antibody,  
pref. CFD-OA-pl85-1 that recognises the surface antigen of target cell,  
and (b) an anti-human lymphocyte antibody, pref. anti CD3 antibody that  
works signal transfer by binding to the effector cell.

A new anticancer drug contains the complex antibody as an  
essential component.

USE/ADVANTAGE - The antibody has strong and specific binding  
affinities to antigens (target cell and effector cell). Cytotoxicity  
against target cells can be activated and increased.

In an example, UCHT1 antibody contg. as cites was obtd. by  
administration of UCHT1 cell (anti CD3E antibody) to BALB/c mouse  
intraperitoneally. From the supernatant, UCHT1-F(ab') fragment was  
prepd.. Similarly, CFD-OA-pl85-1 antibody contg. as cites was obtd.,  
and, GFD-OA-pl85-1-F(ab')2 fragment was prepd.. By using two fragments,  
bifunctional antibody of both monomers bonded was obtd.. It was  
purified by TSK gel G 3000 SW HPLC. Dwg.0/0

Int Class: @B04@; @D16@;

Int Pat Class: @A61K-039/395@; @C07K-015/28@

19/37,DE/33 (Item 33 from file: 351)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-213775

(43) 公開日 平成5年(1993)8月24日

(51) IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	ADU G	8413-4C		
	T	8413-4C		
	Z	8413-4C		
C 0 7 K 15/28		7731-4H		

審査請求 未請求 請求項の数6 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平4-19968	(71) 出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(22) 出願日	平成4年(1992)2月5日	(72) 発明者	杉山 孔宏 徳島県板野郡北島町中村字蛇池1-6メゾン・ド・フローラ106号
		(72) 発明者	柏原 美紀 徳島県板野郡北島町中村字前須34セジュール浜田1-104
		(72) 発明者	柴森 雅文 徳島県徳島市川内町加賀須野463-10
		(74) 代理人	弁理士 掛樋 悠路 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BFA抗体

(57) 【要約】

【構成】本発明は、複合抗体を構成する一方の抗体がヒトc-e r b B-2特異性抗体であり、他方がヒトリンパ球抗体であることを特徴とする複合抗体、特に標的細胞の表面抗原を認識する抗体が抗ヒトc-e r b B-2抗体であって、エフェクター細胞に結合してシグナル伝達を行なう抗体が抗ヒトリンパ球抗体である上記複合抗体及び該複合抗体を必須成分とする癌治療剤を提供する。

【効果】本発明複合抗体は、癌治療、特にヒト乳癌等の悪性腫瘍治療に有効である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 複合抗体を構成する一方の抗体がヒトc-erbB-2特異性抗体であり、他方がヒトリンパ球抗体であることを特徴とする複合抗体。

【請求項2】 標的細胞の表面抗原を認識する抗体が抗ヒトc-erbB-2抗体であって、エフェクター細胞に結合してシグナル伝達を行う抗体が抗ヒトリンパ球抗体である請求項1に記載の複合抗体。

【請求項3】 抗ヒトc-erbB-2抗体がGFD-OA-p185-1である請求項1又は2に記載の複合抗体。

【請求項4】 抗ヒトリンパ球抗体が抗CD3抗体である請求項1又は2に記載の複合抗体。

【請求項5】 ヒトc-erbB-2関連蛋白に特異的に反応する請求項1又は2に記載の複合抗体。

【請求項6】 請求項3に記載の複合抗体を必須成分とすることを特徴とする癌治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は癌治療に有効な複合抗体、より詳しくはヒト乳癌等の悪性腫瘍治療に有効な複合抗体及び癌治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、癌免疫療法においてモノクローナル抗体は抗体依存性細胞性細胞傷害作用(ADCC; antibody-dependent cellular cytotoxicity)[Martin, J. S., et al., Blood, 73, 1431-1439 (1989)]と或るいは補体依存性溶菌作用(complement-dependent cytotoxicity)[Irie, R. F., et al., Proc. Natl. Acad. U.S.A., 83, 8649-8698 (1986)]に基づく受動免疫により広く臨床試験がなされた。しかしながら、癌治療のために必要な効能のある細胞傷害性免疫反応を誘導するモノクローナル抗体は例外的であった。之等の臨床結果はモノクローナル抗体による癌治療の研究の限界を示すものであった。

【0003】 上記モノクローナル抗体による問題点を克服するための有力な方法として、異なった二種類の抗体分子を解離させ、再結合してハイブリッド抗体を得る試みがなされ、これは古くはウサギポリクローナル抗体を用いて行なわれている[Nisonoff, A. and M. M. Rivers, Arch. biochem. Biophys., 93, 460 (1961)]が、実際にこれが広く知られたのはモノクローナル抗体の作製技術が開発されてからである。[Koehler, G. and C. Milstein, Nature, 256, 495 (1975)]。

【0004】 これら二種類のモノクローナル抗体のそれぞれの半分ずつを化学的に結合させてハイブリッド抗体(モノマータイプ)を作製する方法は数多く報告され、之等は一般にF(ab')<sub>2</sub>分子を材料として作製されている。例えばブレンナン(Brennan)らはDTT(ジチオスレイトール)の還元剤を用いて該F(ab')<sub>2</sub>分子を還元処理し、一方のFab'のSH基を5, 5'-

2

ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)で保護してFab'-SNBとし、他方のFab'-SHと混合することにより、高収率でモノマータイプのハイブリッド抗体を作製することに成功している[Brennan, M., P. F. Davison and H. Pavlus, Science, 229, 81-83 (1985); Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)参照]。

【0005】 また別の方法としては、異なった二種類の抗体分子を架橋剤SPDP[N-スクシンイミジル-3-(1-ピリジルジチオ)プロピオネート]により連結したダイマータイプのハイブリッド抗体を作製する方法[Staerz, U. D., et al., Nature, 314, 628-631 (1985)]や、二種類の抗体F(ab')<sub>2</sub>：フラグメントを同様にして架橋剤SPDPを用いて結合させたダイマータイプのハイブリッド抗体を作製する方法[Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)]等がある。

【0006】 ハイブリッド抗体を作製するもう一つの手段としては、細胞融合法を利用する方法がある。例えば、ある抗原に対する抗体産生ハイブリドーマを、別の抗原で免疫した動物の脾細胞と融合させて、ハイブリッド抗体産生ハイブリドーマを得、該ハイブリドーマの培養によって目的とするハイブリッド抗体を得る方法[Milstein, C. and A. C. Cuellar, Nature, 305, 537 (1983)]や、異なった抗体産生ハイブリドーマを相互に細胞融合させてハイブリッド抗体産生ハイブリドーマを得、これより所望の抗体を得る方法[Staerz, U. D. and M. J. Bevan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 1453 (1986); Lanzavecchia, A. and D. Scheidegger, Eur. J. Immunol., 17, 105 (1987)]等がある。

【0007】 更に、別の型のハイブリッド抗体としては、抗原結合活性を有する可変部(V)領域をマウスハイブリドーマ由来で、免疫活性を有する定常部(C)領域をヒト由来のものにしたものが知られている。該抗体の製造方法は遺伝子組み換え技術を用いて試みられた1984年のモリソン(Morrison)の他、様々な特異性をもつこの種ハイブリッド抗体の作製方法が例示されている[Morrison SL et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851 (1984); Sharon J. et al., Nature, 309, 364 (1984); Neuberger, M. S., et al., Nature, 312, 604 (1984); Boulianne, G. L., et al., Nature, 312, 634 (1984)等]。更に、新しい型のハイブリッド抗体としては、V領域の相補性決定領域(CDR)のみをマウス由来としたもの(Reshaped 抗体)をも例示できる[Jones, P. T., et al., Nature, 321, 552 (1986); Riechman L., et al., Nature, 332, 323 (1988)]。

【0008】 上記ハイブリッド抗体の応用は以下に述べる癌治療の他に、イムノアッセイ系への利用[Suresh, M. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 7989-7993 (1986)]、免疫組織化学での利用[Milstein, C. and A. C. Cuellar, Nature, 305, 537 (1983)]等が報告されて

3

いる。また、上記モノクローナル抗体による癌治療より  
 一步進歩した形でかかる異なった二種類の抗体のハイブ  
 リッド抗体〔複合抗体（以下、BFA; Bifunctional an  
 tibodyと略称する）の一方の抗体が癌細胞と会合した抗  
 原を認識し、該BFAの他方の抗体がTリンパ球のT細  
 胞抗原を認識するBFAを作製することができる。該B  
 FAの構造に基づき、標的とする癌細胞に結合すること  
 ができるBFAが標的癌細胞に対し細胞傷害活性を持つ  
 ことができる。この機序により癌治療への期待がなされ  
 た。その後、インビトロにおいて、BFAの活性がいく  
 つかの腫瘍細胞で研究された[Mezzanica, D., et al., *I*  
*nt. J. Cancer*, **41**, 609-615 (1988); Mansfield, P. F., e  
 t al., *Cancer Immunol. Immunother*, **33**, 247-254 (199  
 1); Oshimi, K., et al., *Blood*, **77**, 1044-1049 (1991)  
 ; Nitta, T., et al., *E. J. Immunol.*, **19**, 1437-1441 (1  
 989)]。

【0009】更に神経腫瘍、卵巣癌、肺癌に対してもB  
 FAの臨床研究が着手された[Nitta, T., et al., *Lance*  
*t*, **335**, 368-371 (1990); de Leij, L., et al., *Fonda*  
*tion Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis Fr*  
*ance*, 249-253 (1990)]。

【0010】一方、近年、細胞生物学の著しい進歩によ  
 り細胞における増殖因子レセプターと発癌との係わりが  
 注目されてきた。数ある癌遺伝子産物のうちの一つとし  
 て特に受容体型チロシンキナーゼ（チロシン残基特異的  
 蛋白質リン酸化酵素）のうち、上皮細胞成長因子(epide  
 rmal growth factor; EGF)と該EGFの受容体（レ  
 セプター）と酷似する蛋白質をコードする関連癌遺伝子  
 として見い出されたc-erbB-2遺伝子[Yamamoto,  
 T., et al., *Nature*, **319**, 230-234 (1986)]の癌遺伝子  
 産物であるp185遺伝子は、種々のヒト悪性腫瘍にお  
 いて該遺伝子の増幅と癌遺伝子産物の高発現が認められ  
 ており、特に乳癌、胃癌、肺癌、膵臓癌中に高頻度のc  
 -erbB-2遺伝子の増幅が認められている。その腺  
 癌、特に乳癌については、ヒト乳癌と乳癌由来の培養細  
 胞にc-erbB-2遺伝子の増幅が認められ[King, C.  
 R., et al., *Science*, **229**, 974-976 (1985); Yamamot  
 o, T., et al., *Nature*, **319**, 230-234 (1986)]、該c  
 -erbB-2遺伝子の増幅の程度が、乳癌の予後と強い  
 相関を示すことが既に見出されている[Slamon, D. J., et  
 al., *Science*, **235**, 177-182 (1987)]。しかしなが  
 ら、該遺伝子産物の発現は正常成人組織には、極まれに  
 しか認められない[Natali, P. G., et al., *Int. J. Cance*  
*r*, **45**, 457-461 (1990)]。

【0011】上記c-erbB-2蛋白質に対する抗体  
 やモノクローナル抗体も既に開発され、病理材料のみな  
 らず、手術材料を直ちに免疫染色法によって検査する方  
 法も開発されつつあり[Nasuko, T., et al., *Jpn. J. Canc*  
*er Res.*, **80**, 10-14 (1989)]; Yamada, Y., et al., *Jpn.*  
*J. Cancer Res.*, **80**, 1192-1198 (1989)]、c-erb

4

B-2遺伝子産物を認識する抗体としても、例えばc-  
 erbB-2遺伝子のC末端領域を認識するポリクロー  
 ナル抗体、pAb1 (T4881) [トリトンバイオサイ  
 エンス社製(Triton Bioscience Inc.; Alameda, CA)]や  
 キナーゼドメインを認識するポリクローナル抗体Ab-  
 1 [オンコジーンサイエンス(Oncogene Science Inc.; Ma  
 nhasset, NY)]や、c-erbB-2の細胞外ドメイン  
 を認識するモノクローナル抗体、SV2-61r [株式  
 会社ニチレン (特開平2-150293号公報参照)]  
 等が知られ、本発明者らも先に腺癌、特に乳癌の診断剤  
 及び治療剤を提供する目的でヒト乳癌細胞株SK-BR  
 -3 (ATCC寄託番号; ATCC HTB30) の培養上清で免  
 疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髓細胞との融  
 合により形成されたハイブリドーマにより産生され、c  
 -erbB-2関連蛋白質に特異的に反応する抗c-  
 erbB-2モノクローナル抗体、GFD-OA-p18  
 5-1を作製した[Ouzge, Alper, et al., *Cell Growth*  
*& Differentiation*, **1**, 591-599 (1990)]。上記GFD-  
 OA-p185-1抗体は、c-erbB-2遺伝子を  
 発現するヒト癌細胞株SK-BR-3及び、A-549  
 (ヒト肺癌細胞株; ATCC CCL185) のインビトロでの増  
 殖を有意に抑制した(特願平3-229835号)。上  
 記各抗体は、c-erbB-2蛋白質とそれぞれ反応  
 し、c-erbB-2遺伝子産物の発現と関連する疾  
 患、特に腺癌、中でも乳癌等の診断に有用であるが(特  
 開平3-191865号公報参照)、これらの抗体は上  
 記悪性腫瘍の治療剤としては、前記したようにモノクロ  
 ーナル抗体であり、必ずしも良好な治療効果が予想され  
 ない。本発明者らはより一般的な上皮癌に対するBFA  
 による免疫治療法を開発するために、c-erbB-2  
 遺伝子産物に関連するものを標的とするBFAを開発  
 し、インビトロにおけるBFAの抗腫瘍活性を評価し、  
 ここに本発明を完成するに至った。

【0012】尚、c-erbB-2に関連するBFAつ  
 いては、今だ報告はなく、本発明によりBFAを構成す  
 る一方の抗体が抗ヒトc-erbB-2抗体からなる複  
 合抗体を提供することが初めて可能となった。

【0013】

【発明が解決しようとする問題点】本発明はc-erb  
 B-2遺伝子を発現する細胞、特に乳癌、肺癌、胃癌、  
 膵臓癌等の悪性腫瘍細胞等の標的細胞と、細胞傷害性T  
 リンパ球細胞(Cytotoxic T lymphocytes)等のエフェク  
 ター細胞とを特異的に結合させることができ、しかもこ  
 れによって上記エフェクター細胞の有する上記標的細胞  
 に対する細胞傷害活性を増強させ得る新しいBFA(複  
 合抗体)、及びこれを利用した悪性腫瘍等の臨床治療剤  
 を提供することを目的とするものである。

【0014】

【問題を解決するための手段】本発明によれば、BFA  
 (複合抗体)を構成する一方の抗体がヒトc-erbB

5

-2抗体であり、他方がヒトリンパ球抗体であることを特徴とするBFA、殊に標的細胞の表面抗原を認識する抗体が抗ヒトc-erbB-2抗体であって、エフェクター細胞に結合してシグナル伝達を行なう抗体が抗ヒトリンパ球抗体である上記BFA、抗ヒトc-erbB-2抗体がGDF-OA-p185-1である上記BFA、及び上記抗ヒトリンパ球抗体が抗CD3抗体である、ヒトc-erbB-2関連蛋白に特異的に反応する上記BFAが提供される。また、本発明によれば、上記BFAを必須成分とすることを特徴とする癌治療剤が提供される。

【0015】本発明抗体は、抗原（標的細胞及びエフェクター細胞）に対する特異的結合力が強く、またその利用によって、CTL等のエフェクター細胞の有する標的細胞に対する細胞傷害活性を活性化乃至増強させ得る特徴を有しているが、該エフェクター細胞が正常細胞にまで攻撃するような活性化は行なうことなく、更にFcレセプターを介したADCC等による悪影響の可能性をも回避されている。従って本発明抗体は、殊に悪性腫瘍等の臨床治療に有効である。

【0016】以下、本発明抗体、殊に一方の抗体が抗ヒトc-erbB-2抗体のFab'部分であり、他方の抗体が抗ヒトリンパ球抗体のFab'部分であり、之等が結合した本発明抗体の作製法につき詳述する。

【0017】本発明抗体の作製のための材料とする抗体、即ちモノクローナル抗体としては、例えば抗c-erbB-2抗体等の抗体乃至抗腫瘍抗体、及び抗CD3抗体等の抗ヒトリンパ球抗体をそれぞれ利用できる。上記抗c-erbB-2抗体に属する抗c-erbB-2抗体は癌細胞表面に発現しているc-erbB-2遺伝子産物を認識するものであり、これにはGDF-OA-p185-1[Alper, O., et al., Cell Growth & Differentiation, 1, 591-599 (1990)], 遺伝子組換え技術を用いてヒトc-erbB-2遺伝子を適当な発現ベクターに組込んで得られる組換えDNAを適当な動物細胞に導入し、その動物細胞を形質転換し、ヒトc-erbB-2遺伝子を発現している細胞を選択し、その細胞表面に発現している細胞をc-erbB-2モノクローナル抗体作製のための免疫抗原として作製したSV2-61抗体やSV2-61 $\gamma$ 抗体（特開平2-150293号公報）、TAB251抗体、TAB255抗体、TAB256抗体、TAB258抗体、TAB259抗体（PCT公開特許W091-02062号公報）、9G6抗体[Van de Vijver M.J., et al., New Eng. J. Med., 319, 1239 (1988)]等が含まれる。

【0018】更に上記抗ヒトリンパ球抗体に属する抗CD3抗体の具体例としては、UCHT1抗体[抗CD3 $\epsilon$ 抗体：マウスIgG<sub>1</sub>：Beverley, P.C.L. and Callard, R.E., Eur. J. Immunol., 11, 329-334 (1981)；インベリアル・キャンサー・リサーチファンデーション(Imper

6

ial Cancer Research Foundation, UK)], OKT3抗体[抗CD3抗体：マウスIgG<sub>2a</sub>：Kung, P.C., et al., Science, 206, 347-349 (1979)]等を例示できる。該UCHT1抗体はTリンパ球の細胞表面に発現したヒトCD3 $\epsilon$ 抗原を認識する抗体であることが知られている。

【0019】之等各抗体はそれぞれのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを新たに作製するか又は既知のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを利用して、公知の方法[例えばKoebler, G. and C. Milstein, Nature, 256, 495 (1975)等参照]に従い製造することができる。その一般的方法としては、まずモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを適当な培養用培地、例えば10%FCS（牛胎児血清）を含むRPMI-1640培地（日本製薬社製）等を用いて培養する。この培養ハイブリドーマをPBS（リン酸緩衝食塩水）又はFCSを含まないRPMI-1640培地に懸濁させ、該懸濁液を、予めプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）を腹腔内投与して飼育されたBALB/cヌードマウスに腹腔内投与する。上記投与の約7~14日後にマウス腹部が膨れてきた時点で、該マウスの腹腔より腹水を抜き、次いで該腹水を遠心分離して細胞を除き腹水を得る。この腹水から一般的方法、例えばプロテインA[Forsgren, A. and J. Sjoquist, J. Immunol., 97, 822 (1966)]を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を行なうことにより、目的のモノクローナル抗体を採取、精製することができる。上記精製は、より詳しくは1ml当りの腹水に2~4mlの結合バッファー（1.5Mグリシン、3M NaCl, pH8.9）を加えた混合液を、例えばプロテインAセファロイン（チッソ株式会社製）カラムにアブライシ、抗体をカラムに吸着させた後、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH3.0~5.0）で溶出させることにより実施できる。

【0020】上記の如くして得られるモノクローナル抗体からのF(ab')<sub>2</sub>の調製は、既に報告されている方法[例えばParham, P., J. Immunol., 131, 2895-2902 (1983)]に準じて、ペプシン消化させることにより行なうことができる。この調製の具体的一例としては、以下の方法を例示することができる。即ち、まず5~10mgの抗体を含む0.1Mクエン酸ナトリウム溶液（pH4.1~4.5）に、抗体の1/10~1/100倍重量のペプシン（シグマ社製）を加えて混合し、37℃の恒温槽で1~8時間消化反応を行なう。該反応液に1Mトリス溶液を加えてpHを8.0として反応を停止させ、20mMトリス塩酸、2mM EDTA及び150mM NaClからなる溶液（pH8.0：以後「TES緩衝液」という）で平衡化したTSK-SW-G3000（トソー社製）カラムを用いてゲル濾過を行ない、最初のピークをブールする。次に、この反応液に2~4倍容量の結合バッファーを加えてプロテインAカラムにアブライシして素通り画分を回収し、ペプシン未消化

7

の完全な抗体分子をカラムに吸着させて除去する。かくして得られた素通り画分を、分子量10000の膜を用いて限外濾過を行なうことにより、濃縮F(ab')<sub>2</sub>画分が得られる。抗体により収量は異なるが、通常10mgの抗体から約4~6mg程度のF(ab')<sub>2</sub>が得られる。

【0021】上記の如くして得られるF(ab')<sub>2</sub>：フラグメントを用いて本発明抗体、即ち上記標的細胞に対する抗体のFab' [モノマー] とエフェクター細胞に対する抗体のFab' [モノマー] とが結合したBFAは、例えば新田らの方法[Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)]に従って作製することができる。

【0022】上記方法は、まず標的細胞の表面抗原を認識する抗体、例えば抗c-erbB-2抗体のF(ab')<sub>2</sub>：フラグメントを含むTES緩衝液に、最終濃度が1~2mMとなるようにDTT(和光純薬社製)水溶液を加えて、pH7.5で室温にて30分間反応を行なった後、最終濃度が5mMとなるようにDTNB(和光純薬社製)水溶液を加えて、更に室温で30分間反応を行なわせ、この反応液をTES緩衝液で平衡化したセファデックスG25カラム(ファルマシア社製)を用いてゲル濾過を行なうことにより実施され、かくして標的細胞に対する抗体Fab'-SNBを取得できる。別に、エフェクター細胞に結合し且つシグナル伝達を行なう抗体、例えば抗CD3抗体のF(ab')<sub>2</sub>：フラグメントを含むTES緩衝液に、最終濃度が1~2mMとなるようにDTT水溶液を加えて、pH7.5で室温にて30分間反応を行ない、得られる反応液をTES緩衝液で平衡化したセファデックスG25カラムを用いてゲル濾過を行なうことにより、エフェクター細胞に対する抗体Fab'-SHを取得できる。上記で得られるFab'-SHを含むTES緩衝液に、先に得られた標的細胞を認識する抗体のFab'-SNBをほぼ1:1のモル比で加えて、限外濾過膜で濃縮した後、室温で4時間程度反応させることにより、標的細胞に対する抗体のFab' [モノマー] とエフェクター細胞に対する抗体Fab' [モノマー] とが結合した所望のBFAを取得できる。

【0023】上記においては、また抗体Fab'-SNBの作製をエフェクター細胞に対する抗体につき行ない、また抗体Fab'-SHの作製を標的細胞に対する抗体につき行なうこともでき、これによっても所望のBFAを取得することができる。

【0024】かくして得られたBFAをTSK-ゲルG3000SW(トーソー社製)を使用するHPLC(高速液体クロマトグラフィー)に付すことにより、未反応のFab'-チオール誘導体(分子量約55kd)を分離して、分子量約110kdを持つBFAを精製することができる。

【0025】非還元条件下で、0.1% SDS(ドデシ

8

ル硫酸ナトリウム：シグマ社製)の存在下にて、7.5% PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)分析を行なうことにより、上記で精製されたBFAが予想された分子量を持っていることの確認を行なうことができる。

【0026】また、上記方法に従って標的細胞に対する抗体のF(ab')<sub>2</sub>、[ポリマー]とエフェクター細胞に対する抗体F(ab')<sub>2</sub>、[ポリマー]とが結合したBFAを作製することが可能である。該F(ab')<sub>2</sub>、[ポリマー]とF(ab')<sub>2</sub>、[ポリマー]とが結合したBFAを作製する方法については、本発明者らが先に出願した複合抗体の製造法に記載されている(特願平3-229835号参照)。該方法に従って標的細胞に対する腕を複数とする(F(ab')<sub>2</sub>、[ポリマー]利用)とすることによって、得られるBFAは、その標的細胞に対する結合性がより高められ、これによって本発明所望の治療効果が一層増強され得ると考えられる。

【0027】上記如くして得られる本発明のBFAの利用によれば、CTL等のエフェクター細胞の標的細胞に対する傷害活性を高めることができる。例えば、抗c-erbB-2抗体と抗CD3抗体とを用いて作製した本発明BFAを用いれば、c-erbB-2遺伝子産物を細胞表面に発現している癌細胞を効果的に傷害乃至壊死させることができる。之等の事実は、後記する試験例に示すように、既に報告された試験方法[Staerz, U. D. J. W. Yewdell and M. J. Bevan, Eur. J. Immunol., 17, 571-574 (1987); Nitta, T., et al., Eur. J. Immunol., 19, 1437-1441 (1989)]に従う試験により確認できる。

【0028】尚、上記においては、エフェクター細胞として組織適合性抗原型の一一致したリンパ球を用いねばならないという拘束性もなく、例えばクローン化したCTL等を用いることができ、また健康人の末梢血リンパ球(PBL: peripheral blood lymphocyte)を用いてもよく、更にクローン化CTL乃至PBLをインターロイキン-2等の存在下で3日以上培養してLAK(lymphokine activated killer cells)を誘導して用いてもよい。健康人の末梢血リンパ球の調製は、比重分離法に従って以下の如くして行なうことができる。即ち、まずヘパリン採血した健康人の血液10mlに2~3倍重量のPBS緩衝液を加えて混合する。別に、この希釈血液の半量の比重分離液(例えばフィコールバック：ファルマシア社製を用いることができる)を加えた遠沈管に希釈血液の全量を重層した後、400×g、室温で30~40分間密度勾配遠心分離を行ない、遠心後に遠沈管の血漿と比重分離液との間にできる白濁層を吸い取り、10% FCS含有RPMI-1640培地により洗浄する。かくして末梢血リンパ球1~2×10<sup>7</sup>個を得ることができる。またLAKは得られたPBLを10<sup>6</sup>個/mlとなるように10% FCS含有RPMI-1640培地に懸濁し、培地1ml当り10~1000単位のインターロイキ

9

ン-2を加えて培養することにより誘導することができる。

【0029】また放射性同位元素 $^{51}\text{Cr}$ を含むクロム酸ナトリウム( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ )による標的細胞の標識は、まず標的細胞のペレット( $1\sim 2\times 10^6$ 細胞)に、 $3.7\text{MBq/ml}$ の上記クロム酸ナトリウム(NE N社製、第一化学製品社販売)を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下で $60\sim 90$ 分間培養を行ない、次いで培養後に $10\%\text{FCS}$ 含有RPMI-1640培地を用いて十分に洗浄し、過剰の未反応のクロミウム( $^{51}\text{Cr}$ )を

10 除くことにより行なうことができる。かくしてクロミウム( $^{51}\text{Cr}$ )標識標的細胞を取得できる。

【0030】上記クロミウム( $^{51}\text{Cr}$ )標識標的細胞、エフェクター細胞及びハイブリッド抗体を用いた細胞傷害試験は、より詳しくは、まず適当な濃度(通常 $0.01\sim 3\mu\text{g/ml}$ )に希釈したBFAの $100\mu\text{l}$ とエフ\*

$$\text{特異的傷害}\% = [(a-b)/(c-d)] \times 100 \quad (1)$$

[aはBFAを介したエフェクター細胞による標的細胞の特異的 $^{51}\text{Cr}$ 放出を示す実測値を、bは標的細胞のみを培養した時のウェル中の放射能活性(自然放出)を、

20 cは $1\%\text{NP-40}$ (シグマ社製)溶液を用いて標的細胞を溶解させた時の反応液中の放射活性(最大放出)をそれぞれ示す。]

上記細胞傷害試験によれば、本発明BFA、特に抗c-erbB-2抗体のFab'と抗CD3抗体のFab'を用いて作製した本発明BFAは、 $100\text{ng/ml}$ の用量で約 $25\%$ の特異的標的細胞傷害が観察され、このことから高い標的細胞傷害性を有することが確認された(後記する図1-A参照)。これに対して、抗c-erbB-2抗体のF(ab')<sub>2</sub>、フラグメントと抗CD3

30 抗体のF(ab')<sub>2</sub>、フラグメントとを $1:1$ の比率で単に混合した混合液では、 $1000\text{ng/ml}$ まで濃度を上げてても有意な細胞傷害性は認められなかった(後記する図1-B参照)。また、各親のF(ab')<sub>2</sub>、フラグメントも $1000\text{ng/ml}$ まで濃度を上げてても有意な細胞傷害性は認められなかった。

【0032】このように、標的細胞に対する抗体のFab'フラグメントとエフェクター細胞に対する抗体のFab'フラグメントとが結合した本発明のBFAは、これが $10\text{ng/ml}$ という極微量から標的細胞の特異的細胞

40 傷害活性を示す(後記する図1-A参照)ことから、c-erbB-2遺伝子産物を細胞表面に発現している癌細胞による悪性腫瘍の治療剤、特に乳癌治療剤として有用である。

【0033】また本発明BFAは、その標的細胞に対する高い結合力維持性を応用して、上記治療剤の他にも、例えば従来のモノクローナル抗体に代わって、各種の診断薬として利用できる。

【0034】以上のように、本発明抗体は悪性腫瘍治療剤として有効であり、従って本発明にかかる悪性腫瘍治

10

\*エフェクター細胞 $10^6/100\mu\text{l}$ とを混合し、室温で $30$ 分間反応させ、反応液を $10\%\text{FCS}$ 含有RPMI-1640を用いて洗浄し、抗体の結合したエフェクター細胞を沈殿として回収する(この操作で未反応のBFAを除くことができる)。次に、各濃度の抗体が結合したエフェクター細胞のそれぞれ $150\mu\text{l}$ (エフェクター細胞数: $2\times 10^5$ )と、標的細胞の $50\mu\text{l}$ (細胞数: $10^4$ )とを、それぞれ $96$ 穴のU底培養プレート(コーニング社製)の各ウェルに添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下で培養して、標的細胞の特異的傷害反応を行なう。反応後に各ウェルの放射能活性をカウントする。BFAを介して、エフェクター抗体と標的細胞とを結合させた時に起こる標的細胞の特異的傷害の程度(%)は、次の計算式(1)に従って求めることができる。

【0031】

療剤をも提供するものである。この本発明悪性腫瘍治療剤は、上記BFAをその必須成分として含有することを基本として、他は通常の製剤技術乃至この種BFAを用いる免疫療法等で慣用されている技術手段に従い調製することができる。即ち、該治療剤は通常本発明抗体と共に適当な医薬製剤担体を配合して製剤組成物の形態に調製される。用いられる担体としては使用形態に応じた製剤の調製に通常慣用される各種のもの、例えば充填剤、増量剤、結合剤、表面活性剤、緩衝液、安定化剤等の賦形剤乃至希釈剤のいずれでもよく、調製される製剤形態は、これが本発明治療剤成分を効果的に含有する状態であればよく、例えば錠剤、粉末剤等の固剤であってもよいが、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の注射剤形態とするのがよい。またこれは使用前に適当な担体の添加により液状となし得る乾燥品の形態とすることもでき、いずれの形態も常法に従い調製できる。また各形態の製剤はその形態に応じて適当な投与経路、例えば注射剤形態の製剤では静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与され、固型形態の製剤は経口乃至経腸投与される。勿論、予め体外でリンパ球等に本発明抗体を反応させてから、それを静脈内、腹腔内、感染病巣等に投与することも有用な方法である。

40 【0035】本発明治療剤の投与量は該製剤の投与方法、投与形態、使用目的、適用患者等に応じて適宜決定され一定ではないが、一般には本発明抗体の量が約 $0.00001\sim 80$ 重量%程度含有されるものとするのがよく、この製剤は一日成人一人当たり約 $0.01\mu\text{g}\sim 10\text{mg}$ 程度の範囲で適用されるのが好ましい。かくして本発明治療剤の投与によれば、これを投与された患者の体内においてリンパ球の細胞傷害性が増強され、かくして所望の治療効果が奏される。

【0036】また、本発明治療剤を用いた免疫療法の



バ球を何等かの手段で活性化した後、再度患者生体内に戻して治療を行なう方法は、例えば次の如くして実施できる。即ち、患者の末梢血約100mlからリンバ球を分離し、IL-2約100U/mlを添加した無血清培地で約1週間程度培養し、得られるLAK細胞（リンホカイン活性化キラー細胞）約 $1 \times 10^8$ 個を本発明のBFA約100~1000 $\mu$ g、好ましくは約100 $\mu$ g前後と共に患者体内に注入することにより実施され、この処置は患者の病状、年齢等に応じて通常週に数回に分けて行なうことができる。

#### 【0037】

【発明の効果】本発明抗体は、抗原（標的細胞及びエフェクター細胞）に対する特異的結合力が強く、その利用によりCTL等のエフェクター細胞の有する標的細胞に対する細胞傷害活性を活性化乃至増強させ得る特徴を有している。

#### 【0038】

【実施例】以下、本発明BFA及びこれを用いた悪性腫瘍治療剤につきより詳細に説明するため、実施例を挙げる本発明はこれに限定されない。

#### 【0039】

##### 【実施例1】BFAの製造

##### 1) UCHT1腹水の調製

UCHT1細胞 [抗CD3 $\epsilon$ 抗体：マウスIgG<sub>1</sub>：Beverley, P.C.L. and Callard, R.E., Eur. J. Immunol., 11, 329-334 (1981)；インベリアル・キャンサー・リサーチファンデーション(Imperial Cancer Research Foundation, UK)より入手] を10%FCS（フロー社製）を含むRPMI-1640培地（日本製薬社製）を用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養してハイブリドーマを得た。

【0040】別にBALB/c（日本チャールズリバー社製）の腹腔内に、一匹当たり0.5mlのプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン、和光純薬社製）を投与して1~2週間飼育を行なった。

【0041】次に先に得られたUCHT1細胞を、PBSに懸濁し、その $1 \times 10^7$ 細胞/0.5mlずつを各マウス腹腔内に投与した。上記投与の2~3週間目にマウスの腹腔が膨れてきた時点で、マウスの腹腔より腹水を抜き、該腹水を日立遠心機05PR-22（日立製作所社製）を用いて10000rpm、30分間、4℃で遠心分離し、UCHT1抗体を含む腹水上清を得た。

【0042】2) UCHT1-F(ab')<sub>2</sub>：フラグメントの調製

上記1)で得られたUCHT1腹水上清に2倍容量の1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液（pH8.9）を加えて混合し、混合液を、固定化プロテインA（Immobilized-Protein A (Repligen社)）カラムにアブライシ、UCHT1抗体をカラムに吸着させた。充分に1.5Mグリシン及び3M NaClからな

る緩衝液（pH8.9）で洗浄した後、吸着しているUCHT1抗体を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH3.0~5.0）で溶出させて、IgG溶液を得た。

【0043】上記で得られたIgG溶液2ml（IgG10mg）を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.1）に対して4℃で一晩透析した。透析液を回収後、これに抗体の1/10~1/25量（w/w）のペプシン（シグマ社製）を加えて混合し、37℃の恒温槽で6~8時間消化反応を行なった。反応後、反応液に1Mトリス溶液1/2容量を加えて反応を停止させ、150mM NaCl含有20mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したTSK-G3000SW（トソー社製）カラム（21.5mmID×60cm）を用いてゲル濾過を行ない、F(ab')<sub>2</sub>：画分をプールした。

【0044】次に、この分取した画分に1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液（pH8.9）を加え、その混合液をプロテインAカラムにアブライして素通り画分を回収し、カラムにペプシン未消化のUHL1抗体を吸着させて除去した。かくして得られた素通りの画部を、分子量10000の膜を用いて限外濾過（アミコン社製、ダイアフローメンブレンYM10、43mm膜を使用）を行ない、バッファーを20mMトリス塩酸、2mM EDTA及び150mM NaClからなる溶液（pH8.0：以後「TES緩衝液」という）に交換して、UCHT1のF(ab')<sub>2</sub>：フラグメントの4mgを得た。

【0045】3) GFD-OA-p185-1腹水の調製  
まずヒトc-erbB-2遺伝子産物を認識する抗体としてのGFD-OA-p185-1抗体を以下のように調製した。即ち、GFD-OA-p185-1抗体を産生するハイブリドーマGFD-OA-p185-1（微生物研第12206号）を上記1)と同様にして培養した後、該細胞をマウスの腹腔内に投与し、該腹水よりGFD-OA-p185-1抗体を含む腹水上清を得た。

【0046】4) GFD-OA-p185-1-F(ab')<sub>2</sub>：フラグメントの調製  
上記2)と同様にして3)で得られたGFD-OA-p185-1腹水上清に2倍容量の1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液（pH8.9）を加えた混合液を、プロテインAカラムにアブライシ、GFD-OA-p185-1抗体をカラム吸着させた。同バッファーで洗浄した後、吸着しているGFD-OA-p185-1抗体を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH3.0~5.0）で溶出させて、IgGを含む溶液を得た。

【0047】上記で得られたIgGを含む溶液2ml（IgG10mg）を、0.1Mクエン酸ナトリウム緩

衝液 (pH 4. 1) に対して4℃で一晩透析した。透析液を回収後、これに抗体の1/10~1/25量 (w/w) のペプシンを加えて混合し、37℃の恒温槽で4~8時間消化反応を行なった。反応後、反応液に1Mトリス溶液1/2容量を加えて反応を停止させ、150mM NaCl含有20mMリン酸緩衝液 (pH 7. 0) で平衡化したTSK-G3000SWカラムを用いてゲル濾過を行ない、F(ab')<sub>2</sub>画分をブールした。

【0048】次に、この画分に1.5Mグリシン及び3M NaClからなる緩衝液 (pH 8. 9) を加え、その混合液をプロテインAカラムにアプライして素通り画分を回収し、カラムにペプシン未消化のGFD-OA-p185-1抗体を吸着させて除去した。かくして得られた素通りの画部を、分子量10000の膜を用いて限外濾過を行ない、バッファーをTES緩衝液に交換して、GFD-OA-p185-1のF(ab')<sub>2</sub>：フラグメント5mgを得た。

【0049】5) GFD-OA-p185-1 Fab' とUCHT1-Fab' とのBFAの作製  
上記4) で調製したGFD-OA-p185-1抗体のF(ab')<sub>2</sub>：フラグメント3mgを含む1.0ml TES緩衝液に、20μlの100mMジチオスレイトール (DTT；和光純薬社製) 水溶液を加えて、pH 7. 5、室温にて30分間反応を行なった後、引き続き10mM DTNB水溶液 (和光純薬社製) 1~2倍量を加えて、更に室温で30分間反応を行なわせた。この反応液を窒素ガスで置換したTES緩衝液で平衡化したセファデックスG25カラムを用いてゲル濾過し、最初のピークをブールして、GFD-OA-p185-1-Fab' の混合ニトロフェニルジスルフィド誘導体 (GFD-OA-p185-1-Fab'-SNB) を取得した。

【0050】別に、上記2) で調製したUCHT1抗体のF(ab')<sub>2</sub>：フラグメント3mgを含む1.0ml TES緩衝液に、20μlのDTT水溶液を加えて、pH 7. 5で室温にて30分間反応を行なった後、得られた反応液を窒素ガスで置換したTES緩衝液で平衡化したセファデックスG25カラムを用いてゲル濾過し、最初のピークをブールして、UCHT1-Fab'-SH を取得した。

【0051】上記UCHT1-Fab'-SHに、先に調製したGFD-OA-p185-1-Fab'-SNBを加え、限外濾過膜 (YM10) で濃縮後、室温で4時間反応させ、以後、4℃で反応を継続させることによって、GFD-OA-p185-1-Fab' とUCHT1-Fab' のモノマー同士が結合したBFAを得た。

【0052】上記で得られたBFAを含むTES緩衝液をTSKゲルG3000SW (トソー社製) を使用したHPLC (高速液体クロマトグラフィー) 又はイオン

交換クロマトグラフィーやハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーに付すことにより未反応のFab'-チオール誘導体 (分子量約55kd) から目的のBFAを分離して精製した。

【0053】精製したBFAを非還元条件下で、0.1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、シグマ社製) 存在下に、7.5% PAGE分析を行ない、精製したBFAの分子量を確認した。

【0054】上記SDS-PAGEの結果、分子量約110kdの位置にバンドを確認し、このことからBFAは予想した分子量約110kdをもつことが確認された。

【0055】

【実施例2】実施例1で得られた本発明BFAとGFD-OA-p185-1-F(ab')<sub>2</sub>：フラグメント及びUCHT1-F(ab')<sub>2</sub>：フラグメントとの免疫学的反応性を、7つのヒト癌細胞株と健常ヒトボランティアから調製した末梢血リンパ球 (PBL) を使用して以下の通り試験した。

【0056】この試験には、以下に示す7つのヒト癌細胞株 (いずれもアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ATCC；Rockville, Md. U.S.A. より入手) を用いた。

【0057】ZR-75-1 (ヒト乳癌細胞株：ATCC CRL1500)

SK-BR-3 (ヒト乳癌細胞株：ATCC HTB30)

MCF-7 (ヒト乳癌細胞株：ATCC HTB22)

30 PANC-1 (ヒト膵臓、上皮癌細胞株：ATCC CRL1469)

MIAPaCa-2 (ヒト膵臓癌細胞株：ATCC CRL1420)

ASPC-1 (ヒト転移性膵臓癌細胞株：ATCC CRL1682)

BxPC-3 (原発性ヒト膵臓癌細胞株：ATCC CRL1687)

上記7つのヒト癌細胞株と健常ボランティアのPBLを、それぞれ0.1% BSA及び0.1% NaN<sub>3</sub>を含むPBS緩衝液で洗浄した後、同PBS緩衝液中に10μgの各抗体を加え、氷上にて30分間反応させた。反応後、細胞を2回洗浄し、次いでFITC-複合抗マウスIgG (Tago Inc., U.S.A. 社製) を加え、更に氷上にて30分間反応させた。反応後、2回洗浄し、次いで各抗体の反応活性をオルト・スペクトラムIII (Ortho Diagnostic Inc., U.S.A. 社製) を使用したフロー・サイトメトリーによって測定した。尚、陽性細胞は対数表示蛍光強度を所有しているものとして定量した。

【0058】その結果を第1表に示す。

50 【0059】

【表1】

第 1 表

細 胞	対 照 <sup>a)</sup>	F ( a b' ) ? フラグメント		
		抗 c - e r b B - 2 遺伝子産物	抗 CD 3	B F A
P B L	2. 7 <sup>b)</sup>	4. 9	8 2. 7	8 2. 8
Z R - 7 5 - 1	8. 2	8 5. 5	2. 6	9 2. 9
S K - B R - 3	2. 0	9 9. 5	2. 9	9 9. 9
M C F 7	4. 8	4 0. 3	1. 9	4 7. 4
P A N C - 1	4. 6	2 4. 4	3. 6	2 5. 9
M I A P a C a - 2	2. 2	6 1. 4	5. 2	6 1. 9
A s P C - 1	9. 6	3 3. 5	N T	2 2. 1
B x P C - 3	2. 8	8. 8	2. 4	8. 6

a) : 第2抗体のみ

b) : 各抗体と反応した細胞%

【0060】該表中、数字は各抗体と反応した多彩防のパーセント(%)を示す。またコントロール(対照)は第2抗体のみを表わし、NTは未試験を示す。

【0061】該表より、抗c-erbB-2遺伝子産物 F ( a b' ) : フラグメントは、2つの乳癌細胞株 ZR-75-1 及び SK-BR-3 に対して強く反応した。之等の2つの癌細胞株は、豊富にc-erbB-2 mRNAを発現することが知られている癌細胞株である [Kraus, M.H., et al., EMBO J., 6, 605-610 (1987)]。またこの F ( a b' ) : フラグメントは、癌細胞株 MCF-7、PANC-1、MIAPaCa-2 及び ASPC-1 と弱い反応性(前の2つの癌細胞株に比較して)を示し、癌細胞株 BxPC-3 に対してはほとんど反応性を示さなかった。更に、PBLとは反応しなかった。

【0062】抗CD3ε F ( a b' ) : フラグメントは、PBLにのみ反応し、癌細胞株とは反応しなかった。本発明BFAは、2つのヒト乳癌細胞株 ZR-75-1 及び SK-BR-3 と PBL に対して強く反応した。また該BFAの反応活性は、他のヒト癌細胞株に対しては上記抗c-erbB-2遺伝子産物 F ( a b' ) : フラグメントと同様であった。

【0063】之等の試験結果から、本発明のBFAは期待された免疫学的特徴を保有するものであることが明らかとなった。

【0064】

【実施例3】実施例1で得られた本発明BFAの細胞傷害活性測定を、エフェクター細胞としてPBLを、標的細胞としてZR-75-1及びSK-BR-3をそれぞれ使用して、BFAを介して之等各エフェクター細胞と標的細胞とが結合した時に起こる標的細胞の特異的な溶解を指標として、以下の方法に従い実施した。

【0065】① 標的細胞の<sup>51</sup>Crによる標識  
10%FCSを含むRPMI-1640培地を用いて、ZR-75-1細胞及びSK-BR-3細胞を、37℃で5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。次に、培養上清を除去し、PBS(-) 25mlで洗浄後、それぞれの培養細胞に0.05%トリプシン-0.05%EDTA-PBS溶液2.5mlを加え、37℃で1分間インキュベートして、細胞を剥がし、10%FCS含有RPMI-1640培地20mlに懸濁させて中和し、1000rpm、8分間室温で2回同培地で遠心洗浄した。

【0066】次いで、得られた各細胞の沈殿(5×10<sup>6</sup>細胞)に3.7MBqのクロム酸ナトリウム(Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>: NEN社製)を加え、37℃で5%CO<sub>2</sub>存在下で60分間培養を行ない、培養液を10%FCS含有RPMI-1640培地を用いて2回洗浄して過剰のクロム酸ナトリウムを除去し、血球計算盤で細胞数を数えた後、培養液の濃度が2×10<sup>5</sup>細胞/mlとなる

ように10%FCS含有RPMI-1640培地にて希釈した。

【0067】② エフェクター細胞(PBL)の調製  
ヘパリン採血した健常人血液50mlにPBS緩衝液50mlを加えて混合し、別に50mlの遠心管4本に比重分離液(リンボサイトセパレーションメディウム:フロー(Flow Laboratories)社製)を15mlずつ加えておき、先の血液25mlずつを之等各管に重層した。その後、日立遠心機O5PR-22を用いて1500rpm、30分間、室温にて密度勾配遠心分離を行なった。

【0068】遠心後に4本の遠心管中の血漿と比重分離液との間にできる白濁層をパスツールピペットを用いて吸い取り、これを新しい50mlの遠心管に移し、25mlの10%FCS含有RPMI-1640培地を加えて混合し、1000rpm、5分間遠心してPBLを沈殿として回収した。10%FCS含有RPMI-1640培地による洗浄操作を3回繰り返した後、得られた沈殿を10%FCS含有RPMI-1640培地に懸濁させた。

【0069】③ 各抗体の調製  
実施例1で得られた本発明のGFD-OA-p185-1-Fab'-UCHT1-Fab'結合型BFA、このBFA作製の出発材料として用いたGFD-OA-p185-1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントとUCHT1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントとの1:1混合物、GFD-OA-p185-1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメント及びUCHT1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントのそれぞれを、10%FCS含有RPMI-1640培地を用いて、それぞれをマイレックスGVフィルター0.22μm(日本ミリポアー社製)を用いて無菌濾過した後、20ng/ml、200ng/ml及び2000ng/mlの各濃度に希釈調製した。

【0070】④ 細胞傷害活性試験  
上記③で調製した各種濃度の抗体100μl及びエフェクター細胞50μl(細胞数=5×10<sup>4</sup>個、Effector;E)と、標的細胞の50μl(1×10<sup>4</sup>個、Target;T)とを、それぞれ96穴U底培養プレート(ファルコン(Falcon)社製)の各ウェルに添加(Effector/Target=E/T=5)し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で4時間培養して、標的細胞の特異的傷害反応を行なわせた。次に、培養上清をスーパーネータント・コレクション・システム(大日本製薬社製)で採取し、測定チューブに入れ、該チューブ内に含まれる放射能活性をカウントした。また、上記と同様な条件でそれぞれの抗体を、エフェクター細胞と標的細胞の比率(E/T)を0、10及び20に代えて、反応させた。

【0071】各抗体を介してエフェクター細胞と標的細胞とを結合させた時に起こる標的細胞の特異的傷害活性

の程度(%)を、前記計算式(1)に従って求めた。

【0072】得られた結果を図1及び図2に示す。

【0073】図1はZR-75-1細胞に対して本発明BFAを用いた結果を示しており、図2はZR-75-1細胞に対してGFD-OA-p185-1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントとUCHT1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントとの1:1混合物を用いた場合の結果を示している。

【0074】各図において横軸は用いた抗体の絶対量(ng/ml)を、縦軸は標的細胞の特異的傷害(% Specific Cytotoxicity)を示し、図中(1)はE/T=0の場合を、(2)はE/T=5の場合を、(3)はE/T=10の場合を、また(4)はE/T=20の場合を、それぞれ示す。

【0075】上記図1より、PBLと結合した本発明のBFAはZR-75-1細胞のケースにおいて、有意な細胞傷害活性を保有することが確認された。この細胞傷害活性の発現に必要なBFAの濃度は、10ng/ml以上であり、またE/T比は5以上であった。また、本発明BFAは100ng/mlの用量で且つE/T比が20で最大約25%の特異的標的細胞傷害が観察でき、このことから高い標的細胞傷害活性を有することが確認された。これに対して、GFD-OA-p185-1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントとUCHT1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントとの1:1混合物を用いた場合は、1000ng/mlまで濃度を上げて有意な細胞傷害活性は認められなかった(図2参照)。

【0076】更に、GFD-OA-p185-1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメント及びUCHT1-F(ab')<sub>2</sub>、フラグメントのそれぞれを用いて同一試験を行なった結果、之等の各フラグメントは1000ng/mlまで濃度を上げて有意な細胞傷害活性は認められなかった。

【0077】以上の結果より、本発明BFAは10ng/mlという極微量から標的細胞の特異的細胞傷害活性を示し、このことからc-erbB-2遺伝子産物を細胞表面に発現している癌細胞よりなる悪性腫瘍の治療剤、特に乳癌治療剤として有用であることが分かる。

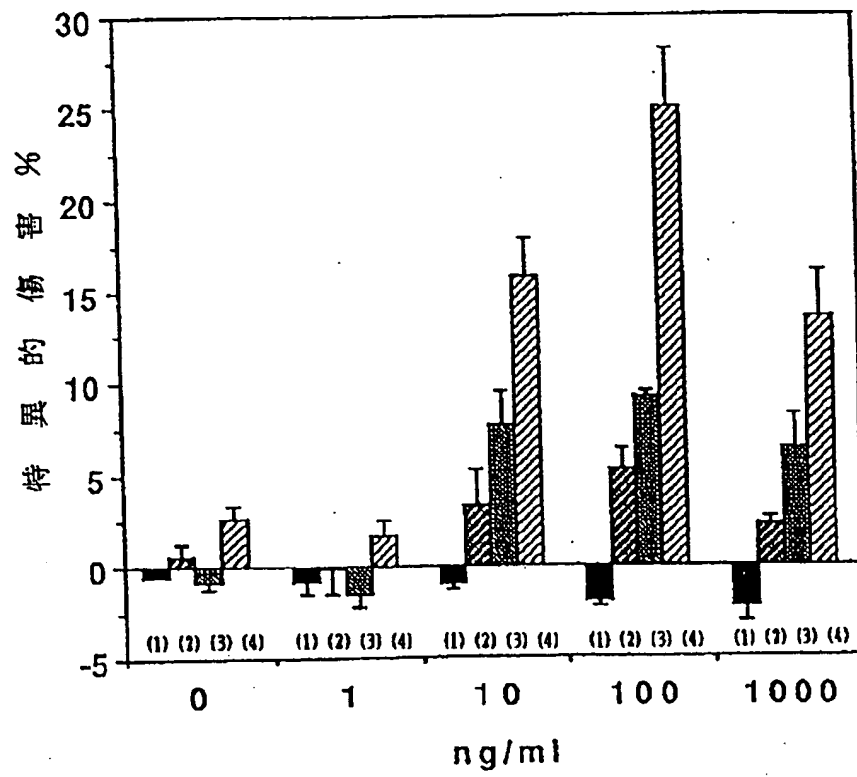
【0078】また本発明BFAの標的細胞に対する高い結合力維持性を応用すれば、本発明所望の上記治療剤の他にも、例えば従来のモノクローナル抗体に代わって、各種の診断薬としての利用も期待できる。

【図面の簡単な説明】

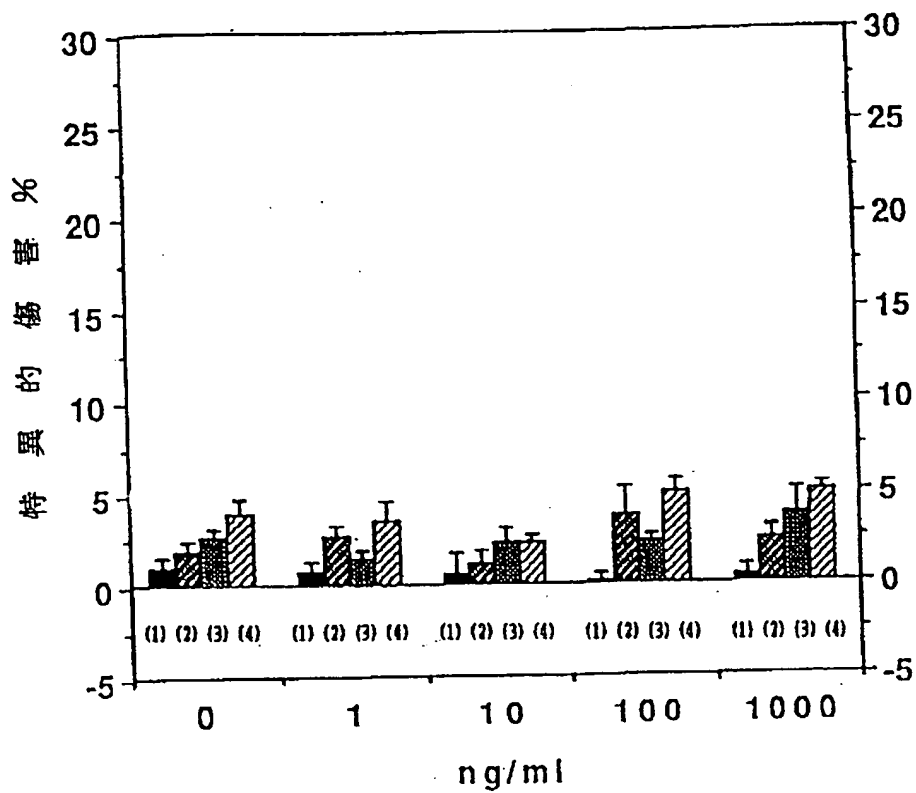
【図1】本発明BFAの細胞傷害活性を調べたグラフである。

【図2】図1と対比して対照とする抗体混合物の細胞傷害活性を調べたグラフである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 出口 恭平  
徳島県徳島市末広4丁目1-9-703号

(72)発明者 今川 健一  
徳島県板野郡北島町新喜来字北ハリ1-83  
(72)発明者 菊地 幹雄  
神奈川県鎌倉市今泉台4-29-14